第36卷 第4期 昆虫学报 Vol. 36, No. 4
1993年11月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Nov., 1993

刀豆氨酸对亚洲玉米螟的生理生化效应

程振衡　汪文陆
（南开大学生物学系，天津 300071）

摘要 本文报道亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 五龄幼虫注射0.25—1.0毫克/克刀豆氨酸48小时后有关生理生化的变化，其中血淋巴蛋白质电泳区带数目减少，浓度降低，而游离氨基酸总量明显增加，其中脯氨酸和谷氨酸的变化最为明显。虫体酸性磷酸酯酶的活性显著升高，而精氨酸酶的活性却有所降低。刀豆氨酸可引起虫体内尿素含量下降，而对尿酸含量影响不大。经刀豆氨酸处理后发育成长的成虫其雌虫卵巢和雄虫附腺的蛋白质合成均显著下降，并对上述结果做了简要的讨论。

关键词　亚洲玉米螟　刀豆氨酸　血淋巴蛋白质　氨基酸

刀豆氨酸是一种非蛋白质氨基酸，系精氨酸的类似物，普遍存在于豆科植物的种子中，对多种昆虫的生长发育有明显的抑制作用。据报道，用刀豆氨酸防治烟草天蛾 *Manduca sexta* 效果较好（Dahlman, 1980）。Koul（1985）试图用这种物质防治斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 发现，对早龄幼虫的生长发育影响明显。有关刀豆氨酸对烟草天蛾的毒性作用机理 Rosenthal 等已有较多的研究，认为刀豆氨酸能替代精氨酸参与虫体蛋白质的合成（Rosenthal 和 Thomas, 1985），进而影响这些生物大分子的正常生理机能（Rosenthal 等，1989），但对虫体生理过程的影响却是一个复杂的过程（Lenz 等，1986）。本文作者对亚洲玉米螟的研究表明，刀豆氨酸不仅影响试虫的生长发育过程，而且对其生殖力也有明显的抑制作用（程振衡和朱志强，1986），为了进一步了解刀豆氨酸对该试虫的毒性，本文就刀豆氨酸对亚洲玉米螟多种生理生化过程的影响进行了研究。

材料和方法

1. 材料　刀豆氨酸为 Sigma 公司产品，亚洲玉米螟由室内连续饲养供应，饲养方法和条件同周大荣等（1980）。

2. 处理方法　将刀豆氨酸用玉米螟生理盐水（OFS）（程振衡和朱志强，1986）配成浓度为1.25%、2.5%和5%的注射液，按照0.25%、0.50%和1.0毫克/克的剂量注射5龄初期幼虫（试虫平均体重为50±5毫克，注射量为1微升），处理后在正常条件下饲养48小时备用。

3. 血淋巴蛋白质的分析　采用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法分析血淋巴蛋白质，电泳条件为：浓缩胶浓度2.5%（pH6.7），分离胶浓度3.5—28%（pH8.9），电泳电流20mA，4℃条件下进行，染色液为0.1%的考马氏亮蓝 G_{250}，用7%的乙酸配制。

血样制备：取试虫剪破一臀足取血，加入少量苯基硫脲（PTU）防止黑化，以等量的电泳缓冲液稀释，于5000转/分离心10分钟，取上清液测试。

本文于1991年7月收到。

4. 血淋巴游离氨基酸的测定　取上述血样 0.2 毫升，加入 0.8 毫升 5% 磺基水杨酸，摇匀后于 0℃ 过夜，于 12000 转/分离心 30 分钟，取上清液用 0.2mol/L 盐酸稀释 10—50 倍，用 Hitachi 831-50 型氨基酸自动分析仪分析，进样量为 50 微升。

5. 尿素含量的测定　取试虫 10 头于滤纸上爬行 1 小时待排净粪便，在 20m mol/L 硫酸锰溶液(10 毫升/克)中匀浆，于 10000 转/分离心 10 分钟，取 0.2 毫升上清液加入 5.0 毫升显色液（含 0.06% 二乙酰单肟和 0.003% 硫代氨基脲的 45% 磷酸溶液)。水浴煮沸 20 分钟，冷却后于 530 毫微米比色测定。

6. 尿酸含量测定　取前述上清液 1.0 毫升，加入 1.0 毫升 14% 碳酸钠溶液，再加入 1.0 毫升显色液(3.0 克钨酸钠，3.2 毫升磷酸和 3.0 毫升蒸馏水，回流 2 小时后加入 1.6 克硫酸锂，定容 100 毫升)，室温静置 10 分钟，于 700 毫微米比色测定。

7. 精氨酸酶活性的测定　依 Harry 等(1976)进行。根据生成尿素的量计算出精氨酸酶的活性，活性单位为微克/分/克。

8. 酸性磷酸酯酶活性的测定　测定方法同 Coleman (1966)。根据生成百里酚酞的含量计算出酸性磷酸酯酶活性，活性单位为微克/分/克。

9. 同位素标记　取初羽化的成虫(12 小时内)采用体内标记法处理卵巢，用体外标记法处理雄蛾附腺。前者用 0.1mci/毫升的 ^{3}H-亮氨酸生理盐水溶液注入雌蛾体腔(注射量为 4 微升/头)，2 小时后取出卵巢测卵巢蛋白质中同位素的活性；后者用 0.1mci/毫升 ^{3}H-亮氨酸 Grace 培养液于 30℃ 培养雄蛾附腺，1 小时后测定附腺蛋白质中同位素活性。

组织研磨液用三氯乙酸沉淀，去上清液，加入 0.1 毫升高氯酸(60%)和 0.1 毫升双氧水 (30%)，于 70℃ 消化 1—2 小时，冷却后加入 5 毫升闪烁液，用盖革闪烁计数仪测量。

结　　果

1. 刀豆氨酸对血淋巴蛋白质的影响　亚洲玉米螟 5 龄幼虫经刀豆氨酸处理后，血淋巴蛋白质电泳区带趋于减少(图 1)。正常幼虫血淋巴有 11 条蛋白主带，而经刀豆氨酸(剂量为 0.25—1.0 毫克/克)处理 48小时后带 9、10 和 11 浓度趋于减少。

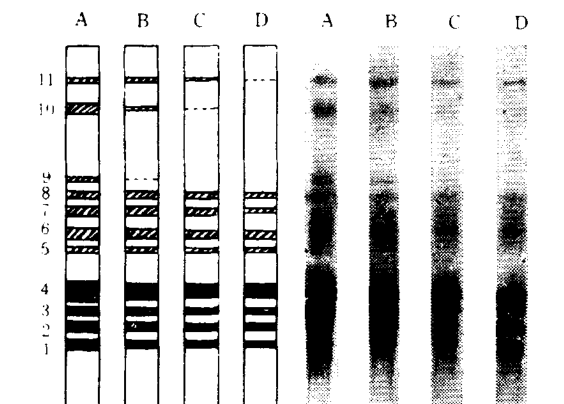


图 1　刀豆氨酸对血淋巴蛋白质的影响
A. 对照 B、C、D 为 0.25、0.50、1.0 毫克/克刀豆氨酸处理组

2. 对血淋巴游离氨基酸的影响　当刀豆氨酸注射剂量为 0.25、0.50 和 1.0 毫克/克、处理 48 小时后，血淋巴游离氨基酸总量（不包含刀豆氨酸）明显升高(表 1)，但对各种游离氨基酸的影响不尽相同。酸性氨基酸(13)和中性氨基酸(1—12)表现出不同程度的增长，其中脯氨酸和谷氨酸的变化较为明显。几种碱性氨基酸(14—16)情况不同，组氨酸的含量变化不大，赖氨酸含量受刀豆氨酸

影响而明显降低。当刀豆氨酸注射剂量为0.25—0.5毫克/克时，精氨酸含量较对照组有所增加，但剂量升高时则含量递减，这可能与精氨酸酶活性的变后有密切的关系。

表1 刀豆氨酸对血淋巴游离氨基酸含量的影响

氨基酸	氨基酸含量(毫克/克×10^{-2})			
	对照组	刀豆氨酸处理组		
		0.25毫克/克	0.50毫克/克	1.0毫克/克
1.甘氨酸	33.7±10.7	35.7±12.9	45.5±20.3	37.7±13.8
2.丙氨酸	31.2±9.2	33.2±11.7	42.0±17.0	38.6±9.6
3.丝氨酸	453.6±18.4	466.9±24.8	485.5±44.7	510.5±23.5
4.苏氨酸	164.9±6.2	176.2±6.2	181.6±12.0	185.6±8.8
5.缬氨酸	30.5±4.7	36.8±2.9	42.0±6.9	42.7±3.6
6.亮氨酸	41.4±11.9	44.6±13.4	42.9±10.6	48.6±10.6
7.异亮氨酸	27.2±4.3	28.2±4.1	28.8±5.7	33.1±5.5
8.胱氨酸	13.6±4.9	14.7±2.9	16.4±3.6	17.5±4.4
9.蛋氨酸	10.5±1.0	12.5±3.2	11.7±2.5	13.2±2.8
10.苯丙氨酸	18.4±3.8	19.3±4.8	17.8±2.6	25.4±9.4
11.酪氨酸	51.2±6.3	54.9±11.5	53.4±7.1	59.8±5.2
12.脯氨酸	67.9±4.5	72.2±1.4	82.8±3.9	80.0±3.0
13.谷氨酸	63.0±4.6	71.8±3.8	80.4±23.8	75.0±2.4
14.组氨酸	198.9±13.8	195.8±5.6	209.2±23.8	200.6±4.8
15.赖氨酸	102.8±10.0	87.8±16.9	76.0±7.1	85.0±10.7
16.精氨酸	94.0±3.2	110.5±0.6	110.5±1.8	97.8±6.8
合计	1408.6±31.6	1454.7±55.3	1516.6±98.4	1549.5±70.8
17.刀豆氨酸	0	33.8±2.9	49.3±5.9	53.0±4.8

注：表中数据均为4次重复的平均值。

表2 刀豆氨酸对虫体尿素和尿酸含量的影响

	对照组	刀豆氨酸处理组		
		0.25毫克/克	0.50毫克/克	1.0毫克/克
尿素(毫克/克×10^{-2}) (占对照组的%)	74.8±6.5	63.6±14.2 (85.0)	62.2±15.9 (83.3)	60.0±13.8 (80.3)
尿酸(毫克/克×10^{-2}) (占对照组的%)	47.1±5.6	48.5±2.1 (97.3)	46.2±3.2 (98.1)	45.3±4.6 (96.2)

注：表中数据均为7—8次重复的平均值。

3. 对虫体尿素和尿酸含量的影响 刀豆氨酸对尿素含量影响较大，表现为降低的趋

势，而对尿酸的含量影响较小(表 2)。

4. 对虫体酸性磷酸酯酶和精氨酸酶活性的影响　刀豆氨酸使虫体酸性磷酸酯酶的活性明显增加，而对精氨酸酶活性则显示倒钟罩形变化规律(表 3)。当刀豆氨酸注射剂量为 0.25—0.5 毫克/克时，酶活性较对照组明显降低；但剂量升高时则酶活性递增。高剂量刀豆氨酸引起精氨酸酶活性递增的原因尚不清楚。

表 3　刀豆氨酸对虫体酸性磷酸酯酶和精氨酸酶活性的影响

	对照组	刀豆氨酸处理组		
		0.25 毫克/克	0.50 毫克/克	1.0 毫克/克
酸性磷酸酯酶 (活性单位) (占对照组%)	14.9±1.2	17.2±1.9 (115.4)	22.3±3.4 (149.7)	23.3±3.2 (156.2)
精氨酸酶 (活性单位) (占对照组%)	331.5±2.6	268.7±16.8 (86.2)	275.2±9.2 (88.4)	308.6±13.2 (93.1)

注：表中数据均为 3 次重复的平均值。

5. 对几种组织的蛋白质合成影响　利用 ^{3}H-亮氨酸被卵巢和雄蛾附腺吸收掺入蛋白质的活性，测试结果表明刀豆氨酸处理后其卵巢和雄蛾附腺的蛋白质合成活性均明显降低(表 4)。对卵巢的影响比雄蛾附腺更加明显，此与前文(程振衡和朱志强，1986)报道刀豆氨酸抑制雌蛾性腺发育，卵管变短，卵细胞数目减少相关。

表 4　刀豆氨酸对 ^{3}H-亮氨酸参与组织蛋白质合成的影响

	对照组	刀豆氨酸处理组		
		0.25 毫克/克	0.50 毫克/克	1.0 毫克/克
卵巢 (cpm/毫克) (占对照组%)	747±58	503±41 (67.3)	494±74 (66.1)	492±41 (65.94)
雄蛾附腺 (cpm/毫克) (占对照组%)	452±15	395±44 (87.4)	369±38 (81.6)	310±34 (68.6)

注：表中数据均为 7 次重复的平均值。

讨　论

已有报道刀豆氨酸在昆虫体内能替代精氨酸参与蛋白质的形成 (Rosenthal 和 Thomas, 1985)，由于异常的刀豆氨酰的形成，使蛋白质的分解代谢速度加快 (Rosenthal 和 Dahlman, 1988)。本试验对亚洲玉米螟的研究也得到与此类似的结果，试虫受刀豆氨酸

处理后48小时，幼虫血淋巴蛋白质电泳区带的数目和浓度均随处理剂量的增加而递减，而血淋巴游离氨基酸总量则明显增加。由于刀豆氨酸易于参与蛋白质的形成，这些蛋白质并不是虫体正常的组成成分，或不能发挥正常的生理功能，其对胞内水解酶的敏感性较高，从而加速蛋白质的分解（Knowles 等，1975）。本试验还发现试虫经刀豆氨酸处理后，体内酸性磷酸酯酶的活性明显增加，这一结果也进一步肯定了上述观点。由于酸性磷酸酯酶是胞内溶酶体标志性水解酶，其活性直接反映溶酶体活性的变化，和其它水解酶共同完成细胞内消化作用（Lockshin，1969）。

刀豆氨酸对血淋巴游离氨基酸的代谢有不同程度的影响，造成大部分氨基酸在血淋巴中聚积。在所有的氨基酸中，只有赖氨酸含量受刀豆氨酸作用而减少，这可能与其自身性质有关，由于该物质在昆虫组织中代谢迅速，在组织代谢活跃期其分解速度可增加四倍(Jungreis，1980)，赖氨酸含量降低也可能间接地反映蛋白质分解代谢加快。精氨酸的代谢与精氨酸酶的关系很大，而刀豆氨酸对精氨酸酶有较为复杂的影响，当刀豆氨酸剂量较低时(0.25—0.50毫克/克)，酶活性降低11.6—13.2%；但当剂量较高时，酶活性反而递增，可能刀豆氨酸对其影响有一定的临界限度，这还有待于进一步的工作加以阐明。由于精氨酸酶活性的变化，血淋巴精氨酸含量呈现出钟罩形变化规律。尿素是精氨酸的代谢产物之一，其含量变化规律也与此基本一致。刀豆氨酸对尿酸的含量影响不大(表2)，这可能与尿酸本身在虫体内复杂的形成过程有关。

此外，刀豆氨酸较明显地影响玉米螟卵巢和雄蛾附腺中蛋白质的合成，使 ^{3}H-亮氨酸掺入蛋白质的量明显减少(表4)。可见刀豆氨酸对亚洲玉米螟多种代谢过程均有影响，综合表现为试虫正常生长发育和变态过程受到严重干扰(程振衡和朱志强，1986)。

参考文献

周大荣等 1980 玉米螟人工繁殖研究1.一种半人工饲料及其改进。植物保护学报 7: 113—21。

程振衡、朱志强 1986 刀豆氨酸对亚洲玉米螟生长发育的影响。昆虫学报 29: 143—8。

Coleman, C.M. 1966 The synthesis of thymophthalein monophosphate, a new substrate for alkaline phosphate. *Clin. Chin. Acta*. **14**: 401—3.

Dahlman, D.L. 1980 Field tests of L-canavanine for control of tobacco hornworm, *M. sexta*. *J. Econ. Entomol*. **73**(2): 279—81.

Harry, P.Y. et al. 1976 Arginase activity in *T. castaneum* and effect of L-canavanine. *Insect Biochem*. 6:273—9.

Jungreis, A.M. 1980 Hemolymph as a dynamic tissue in "Insect Biology in the Future". ed. by L. Michael and D.S. Smith. PP273—94, Academic Press. N.Y.

Knowles, S.E. et al. 1975 Increased degredation rates of protein synthesized in hepatoma cells in the presence of amino acid analogues. *Biochem. J*. **146**: 595—600.

Koul, O. 1985 Foliage spray tests with L-canavanine for control of *Spodoptera litura*. *Phytopasitica* **13**(3/4): 167—72.

Lenz, C. et al. 1986 The effect of L-canavanine and L-cananine on the hemolymph amino acid composition of tobacco hornworm. *Manduca sexta* (Sphingidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol*. **3**(3): 265—76.

Lockshin, R.A. 1969 Lysosomes in insects in "Lysosomes in Biology and Pathology". ed. by J.T. Dingle and H.B. Fell, PP363—91, North Holland Amsterdam.

Rosenthal, G.A. et al. 1989 Canavanine incorporation into the antibacterial proteins of the fly, *Phormia terranovae* (Diptera) and its effect on biological activity. *J. Biol. Chem*. **264** (17): 9768—71.

Rosenthal, G.A. & D.A. Thomas 1985 A radiometric assay for determining the incorporation of L-

canavanine or L-arginine into protein. *Anal. Biochem.* 147(2): 428—31.
Rosenthal, G.A. & D.L. Dahlman 1988 Degradation of aberrent proteins by larval tobacco hornworm. *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Phisiol.* 8(3): 165—72.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF L-CANAVANINE ON THE CORN BORER, *OSTRINIA FURNACALIS* GUENÉE

CHENG ZHEN-HENG WANG WEN-LU
(*Department of Biology, Nankai University, Tianjin* 300071)

When L-canavanine was injected into the body cavity of *Ostrinia furnacalis* larva at doses of 0.25—1.00mg/g body weight, it considerably depressed the amount of hemolymph proteins and significantly increased the level of hemolymph free amino acids, among which proline and glutamic acid were most markedly affected. The whole-body acid phosphatase activity was elevated, while the whole-body arginase activity and urea concentrations decreased. There was no significant changes in uric acid. Incorporations of ^{3}H-leucine into trichloroacetic acid-insoluble substances were significantly reduced in the ovary or male accessory glands of adults from larvae treated with canavanine. It was suggested that the toxicity of canavanine was much dependent on the disturbance of protein and nitrogen metabonism, which in turn affects a series of changes of physiological processes.

Key words *Ostrinia furnacalis* —— L-canavanine —— hemolymph proteins —— amino acids